

構造プロテオミクスのための ハイスループットな無細胞蛋白質発現系

木川隆則・横山茂之

従来とは桁違いのスループットが要求される構造プロテオミクス研究の急激な展開により、ハイスループットな蛋白質発現系として、無細胞蛋白質合成系が注目されている。本稿では、筆者らのグループが進めてきた無細胞系に関する技術開発と、構造プロテオミクス研究への利用について紹介する。

Key words ● 構造プロテオミクス 無細胞蛋白質合成系 NMR X線結晶構造解析

はじめに

理化学研究所ゲノム科学総合研究センター(GSC)タンパク質構造・機能研究グループでは、理化学研究所・構造プロテオミクス研究[RIKEN Structural Genomics Initiative(RSGI), <http://www.rsgi.riken.go.jp>]の中核研究組織として、蛋白質の基本構造と分子機能の網羅的な解明をめざして研究を進めている^{1,2)}。

構造・機能ゲノム科学プロジェクトにおいては、数千という数になる構造解析試料や、10万に及ぶと思われる機能解析試料など、これまでとは桁違いな数の試料を迅速に効率よく調製できる発現系が必要となる。

筆者らは、従来より、無細胞蛋白質合成系を蛋白質発現系として確立するために、さまざまな研究開発を進めてきており、構造・機能ゲノム科学プロジェクトで利用するために、無細胞蛋白質合成系を核とした、ハイスループットな発現系も構築してきた。

本稿では、(1)筆者らが無細胞系に関して行なってきた技術開発、および(2)構造プロテオミクス研究への実際の利用、に関して述べていきたい。なお、本稿だけで概要がわかるようにまとめる都合上、すでに何度か紹介している話をあえて含めているため、内容の重複に関してはご容赦いただきたい。

1. 無細胞蛋白質合成系

蛋白質の構造や機能を研究するためには、目的蛋白質の試料が必要であるため、組換えDNA技術による蛋白質の大量調製は欠くことのできない技術である。通常は、大腸菌、酵母、培養細胞などの生細胞を用いる発現系が利用されているが、生細胞は、自己の細胞機能を維持するために外来蛋白質を排除する傾向が強いため、発現が困難な蛋白質も多かった。

無細胞蛋白質合成系は、生細胞から取り出した蛋白質合成系構成因子を用いて、試験管内で鋳型依存的に蛋白質合成を行なわせる系である。蛋白質合成反応に特化した系であることから、前述の制約を受けにくく、系を人為的に改変することも容易である。そのため、生細胞の発現系が抱える問題点を解決できる有望な手法であると筆者らは考え、これまで研究開発を進めてきた。従来の無細胞系には、合成量が低いという致命的な欠点があったが、筆者らを含めていくつかのグループの研究成果により、この欠点は克服されてきており、現在では、ミリグラムオーダーでの試料の調製も可能となっている。

また、生細胞を用いた発現系では、目的蛋白質を調製するためには、目的蛋白質遺伝子のベクター化、トランスフォーメーション、培養、集菌、溶菌といった工程が、

Takanori Kigawa, Shigeyuki Yokoyama, 理化学研究所ゲノム科学総合研究センター E-mail: kigawa@jota.riken.go.jp, yokoyama@biochem.s.u-tokyo.ac.jp

High-throughput cell-free protein expression system for structural genomics and proteomics studies

各々の目的蛋白質、目的コンストラクトごとに必要である。これに対して、本稿でも紹介するように、無細胞系は直鎖状の DNA 断片をそのまま蛋白質合成の鋳型として利用できるため、生細胞系では必要なこれらの工程を行なうことなく、目的蛋白質を調製することも可能である。さらに、これらの工程が不要であるため、機械化・自動化に向いている、という特徴もある。したがって、多数の蛋白質を、同時並行的に迅速に発現・調製する場合、すなわち、ハイスループットな蛋白質発現には、無細胞蛋白質合成系が適していると考えられる。

このような発想、背景から、筆者らは無細胞系、そのなかでも、大腸菌の抽出液を用いた系の研究開発に取り組んできた。

II. ハイスループットな発現系の構築のための技術開発

1. 多品種発現系の構築

無細胞系では、PCR により増幅した DNA 断片をそのまま蛋白質発現の鋳型として利用できることから、PCR による鋳型作製とうまく組み合わせることにより、cDNA ライブラリーなどの遺伝子資源から、クローニング操作を行なうことなく蛋白質を調製することが可能である。

筆者らは、目的遺伝子ごとに作製するプライマー長を極力短くし、さらに、各種タグ配列の付加を容易に行なえるようにするため、発現用の鋳型 DNA 調製を、2段階の PCR 反応により行なうことにした。まず、各々の DNA に固有のプライマーセットを用いた1段階目の PCR 反応を行ない、ひき続き、発現調節配列(プロモーター、ターミネーター、SD 配列など)やタグ配列(His タグや GST タグなど)をもつ共通プライマーセットによる2段階目の PCR 反応を行なう。各プライマーの濃度などの反応条件を適切に調節することにより、鋳型 DNA の調製を効率よく行なうことができた。次に、この鋳型を用いた無細胞蛋白質合成により、目的蛋白質を発現させる。これらすべての反応は 96 穴ないしは 384 穴のマイクロプレート上で行なうことができるため、多数試料の同時処理が可能となった。

実際に、無作為に選んだマウスの cDNA135 クローン(GSC 遺伝子構造・機能研究グループの林崎良英博士ら

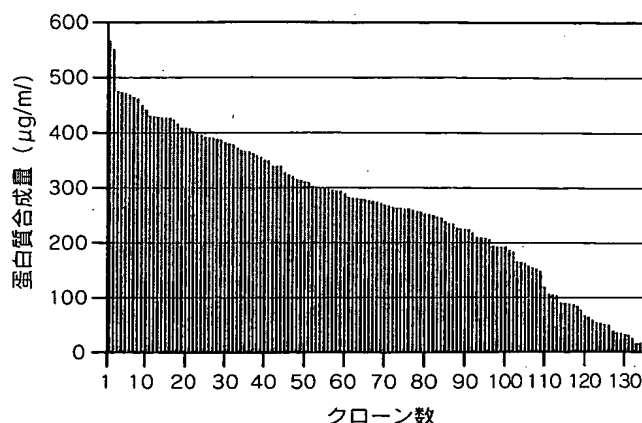


図1 マウス cDNA クローンの発現

PCR 増幅した鋳型を用いて、96 穴プレート上で蛋白質合成反応を行なった 135 クローンについて、可溶性画分(緑)と沈殿画分(赤)を示す。

[口絵 12(p.855)参照]

が作製)を、GST タグ融合蛋白質の形で発現した際の合成量を図1に示す¹⁾。ほとんどの蛋白質に関して、反応液 1 ml あたり 100 μ g 以上の合成量が得られており、選んだクローン中で最も大きな分子量 80 kDa の蛋白質の合成も確認できた。

このように、多数の蛋白質を、同時並行的に、迅速に発現・調製して解析する系を構築することができた。すべての工程をロボットの助けを借りずに手で行なった場合でも、PCR 反応の開始から蛋白質合成反応の終了までの全行程に要する時間は、1 日程度である。この系を用いれば、数百の蛋白質試料を短期間に得ることが可能であり、蛋白質間相互作用の解析など、多数の試料を必要とする蛋白質分子機能の解析研究などに、特に威力を発揮すると思われる。

従来、生細胞の発現系を用いる場合には、1つの蛋白質についてでも、1週間程度を要していたことから考えると、筆者らが構築した系は、まさにハイスループットな発現系であるといっていよいであろう。

2. 大量発現系の構築

前項でもふれたように、無細胞系には、合成量がきわめて低いという問題点があった。反応系自体の改良²⁻⁶⁾とともに、反応方法の改良⁷⁻⁹⁾も検討され、合成量は著しく向上した。反応方法の改良に関しては、10年以上前に、ソ連の A. S. Spirin らが、限外ろ過装置に反応液を入れる方法(フロー法)により、十数時間にわたって蛋

白質合成が持続すると報告した⁷⁾。さらに近年になって、透析機器を用いてより簡便に行なう方法(透析法)が報告された⁹⁾。この原理を利用した無細胞系発現キットは、ロッシュ社から販売されている。

筆者らが独自に改良してきた反応系と透析法を組み合わせると、きわめて高い合成量が得られ、たとえば、CAT(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ)蛋白質の場合であれば、6 mg 以上の目的蛋白質が1 ml の反応液を用いて合成される(図2)⁵⁾。この合成量は、生きた細胞を用いた発現系に匹敵するものであり、筆者らの反応系と透析法の組み合わせは、ミリグラムオーダーの蛋白質を必要とする構造解析のための試料調製法として、十分な能力をもっていることを示している。

3. 立体構造解析のための標識試料系の構築

前節で述べたように、無細胞系を用いて、ミリグラム

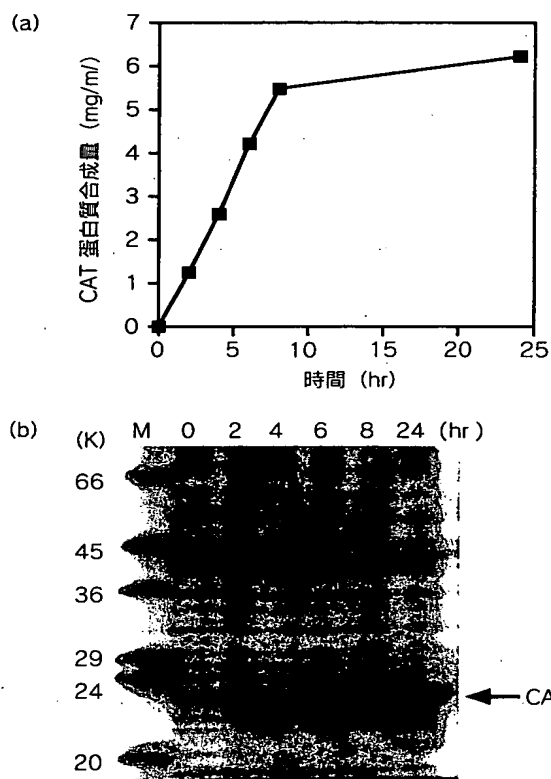


図2 透析法を用いた無細胞蛋白質合成によるCAT蛋白質の合成

(a)蛋白質合成の経時変化。(b)反応開始後、各時間での反応液のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動。

オーダーの蛋白質試料の調製が可能になったことから、立体構造解析に必要な標識試料の調製を試みた。

A. NMR 法のための安定同位体標識試料の調製

NMR法を用いた蛋白質の立体構造決定では、均一 ^{13}C , ^{15}N 標識蛋白質を用いて多核多次元NMR測定を行ない、立体構造情報を得るのが一般的となっている¹⁰⁾。そこで、無細胞系を利用して均一 ^{13}C , ^{15}N 標識蛋白質の調製を試みた⁵⁾。20種類の ^{13}C , ^{15}N 標識アミノ酸を用いて、前述の透析法により、均一 ^{13}C , ^{15}N 標識Ras蛋白質を調製した。大腸菌を用いた発現系により調製した標識蛋白質と同じスペクトルが得られ、各種

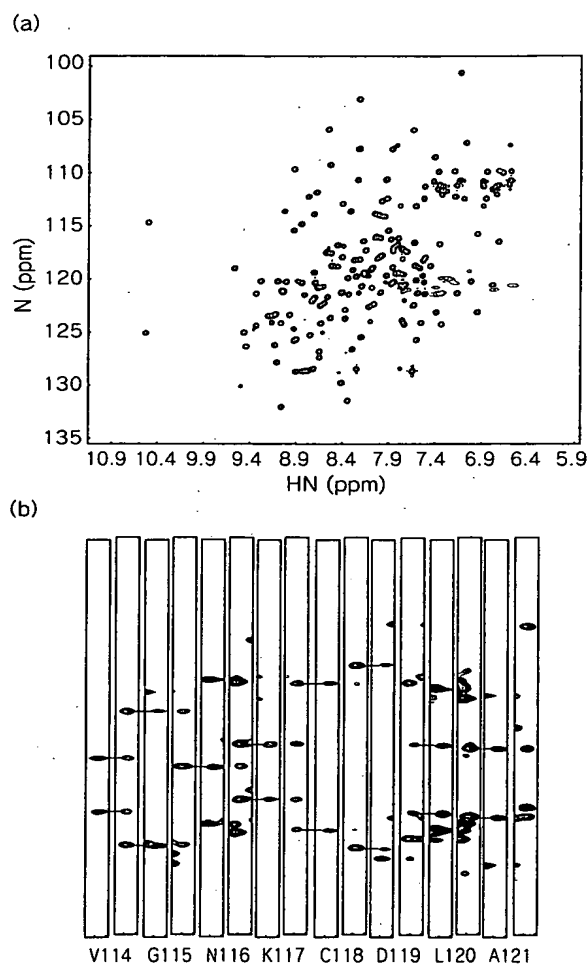


図3 無細胞蛋白質合成により調製した均一 ^{13}C , ^{15}N 標識Ras蛋白質のNMRスペクトル

(a) ^1H - ^{15}N HSQCスペクトル。(b)Val114からAla121までの主鎖シグナルの連鎖帰属。各々の残基ごとに、左: C β CA(CO)NH スペクトル、右: HNCACB スペクトル。

の3次元スペクトルを用いたシグナルの帰属も問題なく行なえた(図3)。この結果から、NMR法のための安定同位体標識試料の調製が、筆者らの無細胞系を用いて可能であることが確認された。

B. X線結晶解析法のためのセレノメチオニン導入試料の調製

X線結晶解析法による立体構造決定においては、多波長異常分散(multiwavelength anomalous diffraction, MAD)法¹¹⁾により、単一の結晶を用いるだけで位相決定が迅速に行なえる。そのため、構造ゲノム科学においては、特に、きわめて有用な手法であると考えられている。この手法のためには、セレノメチオニン(Se-Met)を導入した蛋白質を用いる¹²⁾ことが一般的となっている。生細胞を用いた発現系を利用してSe-Metを蛋白質に導入しようとする場合、Se-Metの強い細胞毒性のために、目的蛋白質の発現量が低い場合も多い。また、アミノ酸代謝系によりSe-Metが代謝されてしまうため、導入率が低くなってしまうことが多かった。

筆者らは、無細胞系を利用することにより、これらの問題を回避してSe-Met導入蛋白質を作製できると考

え、Ras蛋白質へのSe-Metの導入を試みた¹³⁾。反応系のメチオニンにSe-Metに置き換えることのみにより、きわめて高いSe-Met導入率(95%以上)の蛋白質試料を得ることができた。MADデータは、SPring-8のBL44B2ビームラインで測定し、2.0Å分解能のデータを得ることができた。このデータのみを用いて、Ras蛋白質の立体構造を決定した(図4, PDBコード; 1IOZ)。得られた構造を、すでに決定されているRas蛋白質の構造¹⁴⁾(PDBコード; 1Q21)と比較すると、明瞭な電子密度図を得られないループ4とC末端の残基を除いた主鎖原子間のRMSD(2乗平均誤差)は0.32Åであり、両者の構造はほとんど同じであることがわかった。

前述したように、生細胞を用いた発現系の場合、Se-Metの導入率は目的蛋白質ごとに異なり、高い導入率が得られない場合も多い。これに対して、無細胞系を用いた場合には、目的蛋白質の種類にかかわらず、高い導入率が原理的に期待できることから、MAD法のための蛋白質試料の調製法として、無細胞系はきわめて有望であると考えられる。

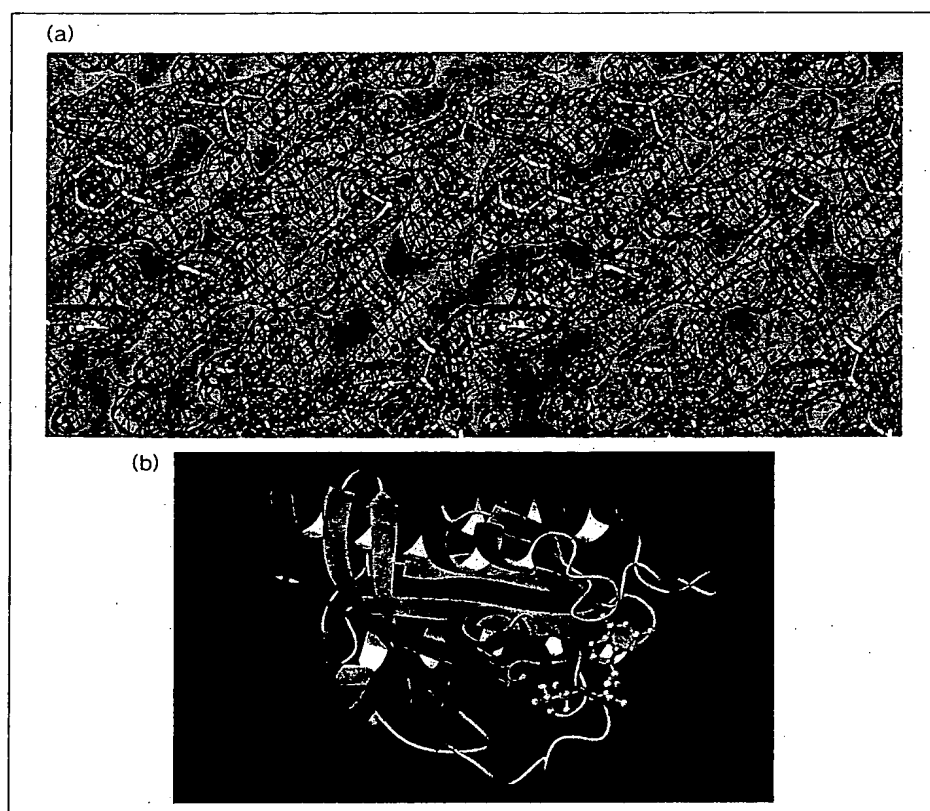


図4 無細胞蛋白質合成により調製したSe-Met導入Ras蛋白質
(a)MAD法により得られた電子密度図(ステレオ図)。(b)決定された立体構造(リボン図)。

III. 構造プロテオミクス研究への利用

RSGIでは、蛋白質の代表的な立体構造と分子機能を、国際協調のもとに、網羅的に決定しようとしている。解析対象となる蛋白質数は万のオーダーになるため、解析対象となる蛋白質を効率よく選び出す過程がきわめて重要である。筆者らは、次のような数段階の過程を経て、解析対象蛋白質の優先順位付けを行なっている。

第1段階としては、バイオインフォマティクスの手法を用いて、ターゲットとなる蛋白質の優先順位付けを行なう。ここでは、まず、配列の相同性に基づいて蛋白質をファミリーに分類する。そのうえで、後生生物や植物に特異的なファミリーや、疾患、シグナル伝達、組換え、転写翻訳、など、特定の生物学的機能に関連したファミリーの優先順位を上げるなど、生物学的な機能の観点から優先順位付けを行なう。また、すでに立体構造が決定されている蛋白質を含むファミリーは、優先順位を下げる。

第2段階としては、実験的な観点からの優先順位付けを行なう。すなわち、試料が構造解析に適していると思われる蛋白質の優先順位を上げる。具体的には、まず、各蛋白質の発現量や可溶性を解析し、発現量・可溶性の高かったものの優先順位を上げる。さらに、優先順位の高いものから、NMRのHSQCスペクトルの測定や、結晶化のスクリーニングを行ない、構造解析への適性を調べる。そして、適性の高い試料から順次構造解析を行なっていく。

この実験的な優先順位付けの過程において、筆者らは無細胞系を積極的に利用している。特に、構造解析のための試料を作製する場合には、付加するタグ配列の種類や位置などのコンストラクトの検討がきわめて重要であり、目的蛋白質1つに対して、数十のコンストラクトを作製することも珍しくない。生細胞の発現系を用いた場合、こういった作業にはきわめて時間と手間がかかったが、筆者らの開発した無細胞多品種発現系を利用することにより、容易に迅速に、上記作業を行ない結果を得ることが可能となっている。現在、バイオインフォマティクスによる第1段階の優先順位付けの結果、優先順位が高いファミリーに属する蛋白質から、順次、発現量や可溶性の解析を進めており、これまで半年間に、約4万コンストラクトの検討を終えている。

さらに、NMR法により構造解析を行なう予定の試料に関しては、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定して、構造形成や安定性を確認し、構造解析への適性を評価している。この目的で用いる ^{15}N 標識試料も、透析無細胞系を利用することにより、20試料以上の同時調製が可能になっており、この点でも、無細胞系の利用により蛋白質発現のスループットは劇的に向上している。

これらの過程を経て、構造解析に適していると判定された蛋白質に関しては、さらにスケールの大きい透析無細胞系を利用して調製している。実際、これまでに、数十種類の均一- $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ 標識蛋白質を調製してきており、いくつかの蛋白質に関しては、すでに、立体構造の決定まで終了している。これらの詳しい結果に関しては、次の機会に紹介したいと考えている。

おわりに

これまで述べてきたように、ハイスループットな無細胞蛋白質合成系を開発し、蛋白質発現系の中核として利用することにより、筆者らは、従来とは桁違いに大きい規模での蛋白質発現を行なうことができるようになった。現在は、各過程において、人手に頼っている部分も少なくないため、機械化・自動化に適しているという意味での無細胞系の特徴を生かし切っているとはいいいがたい。今後、試料調製過程のスループットをさらに高めて、プロジェクトの推進を加速していくために、現在、工程の機械化・自動化を早急に進めているところである。

また、今後、構造プロテオミクス研究が進展していくにつれて、無細胞蛋白質合成系が広く普及していくであろうと信じている。

文献

- 1) Yokoyama, S., Hirota, H., Kigawa, T., Yabuki, T., Shirouzu, M., Terada, T., Ito, Y., Matsuo, Y., Kuroda, Y., Nishimura, Y., Kyogoku, Y., Miki, K., Masui, R., Kuramitsu, S.: *Nat. Struct. Biol.*, 7(suppl.), 943-945 (2000)
- 2) Yokoyama, S., Matsuo, Y., Hirota, H., Kigawa, T., Shirouzu, M., Kuroda, Y., Kurumizaka, H., Kawaguchi, S., Ito, Y., Shibata, T., Kainosho, M., Nishimura, Y., Inoue, Y., Kuramitsu, S.: *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 73, 363-376 (2000)
- 3) Kim, D.-M., Kigawa, T., Choi, C.-Y., Yokoyama, S.: *Eur. J. Biochem.*, 239, 881-886 (1996)
- 4) Yabuki, T., Kigawa, T., Dohmae, N., Takio, K., Terada, T., Ito, Y., Laue, E. D., Cooper, J. A., Kainosho, M., Yokoyama, S.

- S. : *J. Biomol. NMR*, 11, 295-306 (1998)
- 5) Kigawa, T., Yabuki, T., Yoshida, Y., Tsutsui, M., Ito, Y., Shibata, T., Yokoyama, S. : *FEBS Lett.*, 442, 15-19 (1999)
 - 6) Madin, K., Sawasaki, T., Ogasawara, T., Endo, Y. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97, 559-564 (2000)
 - 7) Spirin, A. S., Baranov, V. I., Ryabova, L. A., Ovodov, S. Y., Alakhov, Y. B. : *Science*, 242, 1162-1164 (1988)
 - 8) Kigawa, T., Yokoyama, S. : *J. Biochem (Tokyo)*, 110, 166-168 (1991)
 - 9) Davis, J., Thompson, D., Beckler, G. S. : *Promega Notes Magazine*, 56, 14-18 (1996)
 - 10) Clore, G.M., Gronenborn, A.M. : *Methods Enzymol.*, 239, 349-363 (1994)
 - 11) Hendrickson, W. A. : *Science*, 254, 51-58 (1991)
 - 12) Hendrickson, W. A., Horton, J. R., LeMaster, D. M. : *EMBO J.*, 9, 1665-1672 (1990)
 - 13) Kigawa, T., Yamaguchi-Nunokawa, E., Kodama, K., Matsuda, T., Yabuki, T., Matsuda, N., Ishitani, R., Nureki, O., Yokoyama, S. : *J. Struct. Funct. Genomics*, 2, 29-35 (2002)
 - 14) de Vos, A. M., Tong, L., Milburn, M. V., Matias, P. M., Jancairik, J., Noguchi, S., Nishimura, S., Miura, K., Ohtsuka, E., Kim, S. H. : *Science*, 239, 888-893 (1988)